

Comunicación breve

Degradación de Microcistina–LR mediante ultrasonido. I: influencia del pH y la concentración inicial

RECIBIDO: 02/08/2014

REVISIÓN: 02/09/2014

ACEPTADO: 10/10/2014

Kieffer, Luis A.^{1,2,*} • De la Sierra, Patricia M.^{1,2} • Devercelli, Melina³ • Luna, Julio A.² • Claret, María⁴ • Leiz, Estefanía⁴

¹Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo S/N, 3000, Santa Fe, Argentina.

²INTEC (UNL–CONICET), Güemes 3450, 3000 Santa Fe, Argentina.

³Instituto Nacional de Limnología (UNL–CONICET), Paraje El Pozo S/N, 3000, Santa Fe, Argentina.

⁴Fundación VINTEC, Güemes 3450, 3000, Santa Fe, Argentina.

*E–mail: lkieffer@santafe-conicet.gov.ar

RESUMEN: La microcistina–LR es una de las más conocidas cianotoxinas producidas por las algas verdes, con propiedades tóxicas para muchos organismos (incluidos los humanos). Los métodos convencionales de tratamientos de aguas no la remueven o producen su liberación al destruir las células. En este trabajo se utiliza un método no convencional de tratamiento, como es el ultrasonido, y se analiza su efectividad para degradar la MC–LR a diferentes valores de pH. Se ajustan cinéticas de decaimiento de primer orden, utilizando un algoritmo mediante autómatas celulares.

Los resultados muestran que para pHs neutro o ácidos, se obtiene más del 90 % de la degradación dentro de los primeros 75 minutos. Los tiempos de vida media aumentan desde 12,8 minutos (a pH 4,0) hasta 38,5 minutos (a pH 8,0).

PALABRAS CLAVE: Microcistina–LR, ultrasonido, degradación.

SUMMARY: *Degradation by ultrasound of Microcystin–LR. I: influence OFpH and initial concentration.*

The microcystin–LR is one of the best known cyanotoxins produced by green algae, with toxic properties for many organisms (including humans). Conventional water treatment methods do not remove or produce microcystin release to kill the cells. In this paper, no conventional method of treatment is used, such as ultrasound and its effectiveness is analyzed for the MC–LR degraded at different pH values. First–order decay kinetics was fitted using cellular automata algorithms.

The results show that for neutral or acid pH is obtained more than 90% degradation within the first 75 minutes. The half–life increased from 12.8 minutes (at pH 4.0) to 38.5 minutes (at pH 8.0).

KEYWORDS: Microcystin–LR, ultrasound, degradation.

1. Introducción

La Microcistina-LR (MC-LR) es una de las más conocidas cianotoxinas producidas por algas verdes, debido a que es la fitotoxina que aparece con más frecuencia en los cuerpos de agua como contaminante. Las cianotoxinas poseen propiedades tóxicas para muchos organismos, incluidos los humanos (1). Únicamente algunas cepas de cianobacterias pueden producir toxinas e incluso dentro de la misma especie pueden existir cepas productoras y no productoras, estimándose que en promedio el 50 % de las floraciones de las algas verde-azules en aguas a nivel mundial, son tóxicas (2). Las cianotoxinas se suelen agrupar de acuerdo a los efectos que provocan (3-7) en tres grupos: dermatotoxinas, neurotoxinas y hepatotoxinas. A este último grupo pertenece la MC-LR (4). Estudios a largo plazo realizados en China, sugieren que el consumo de aguas conteniendo microcistinas aumenta la posibilidad de desarrollar tumores y sufrir cáncer de hígado (8,9) (MC-LR está clasificada como posible carcinógeno humano – grupo 2B) (10). El caso más conocido de efectos mortales producidos por el consumo de aguas conteniendo microcistinas, fue el producido en Caruaru (Brasil) en pacientes de hemodiálisis (11). Este hecho enfatizó la posibilidad de aumentar los riesgos de mortandad en este tipo de pacientes, debido al contenido de microcistinas en el agua utilizada (12,13).

Desde el punto de vista estructural químico, las microcistinas pueden clasificarse como heptapéptidos cíclicos, conformadas tanto por aminoácidos proteicos como no proteicos. Existen más de 70 variantes de microcistinas, pero todas ellas responden a la fórmula general (–D-Ala–L–X–D–MeAsp–L–Z–Adda–D–Glu–Mdha), donde D-Ala indica

a la D-alanina (unida en posición 1); D-Glu al ácido D-glutámico (con unión γ en posición 6); luego tiene tres aminoácidos poco comunes: MeAsp indica al ácido D-eritro- β -metilaspartico (con unión γ en la posición 3); Mdha la N-metildehidroalanina en posición 7 y Adda, el ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico en posición 5. Además contiene L-aminoácidos variables en posiciones 2 (X) y 4 (Z) (14,15). Las variaciones de la estructura más comunes son las que se producen por sustituciones de L-aminoácidos diferentes en las posiciones X y Z, así como por las desmetilaciones en las posiciones 3 y/o 7 (16). Una misma cepa productora, puede generar más de una microcistina a la vez. Los aminoácidos en las posiciones X y Z se indican con un sufijo de dos letras. La más común es la microcistina-LR, con un residuo de leucina en la posición 2, y una arginina en la 4 (17).

La MC-LR no es capaz de cruzar las membranas celulares y por esa causa no ingresa en la mayoría de los tejidos. Después de ser ingerida se transporta al torrente sanguíneo por el transportador de ácidos biliares, presente en los hepatocitos y en las células de la mucosa del intestino delgado (18). Luego se concentra en el hígado al ser captada por los hepatocitos (17). La MC-LR es un poderoso inhibidor de serín – proteín – fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A), ya sea de animales como de plantas superiores (19), aunque la inhibición de la PP2A es 40 veces superior a la de PP1 (20).

Las microcistinas son muy estables, resistentes a la hidrólisis y a la oxidación química aún en condiciones ambientales extremas, tal como elevadas temperaturas (21) o muy bajos valores de pH (22). Esto supone un riesgo a la salud humana, cuando se uti-

lizan aguas superficiales como fuente de abastecimiento (23), lo que llevó a la Organización Mundial de la Salud a establecer un nivel guía de $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ para la MC-LR (24). Por esta causa, diferentes técnicas se aplican a las aguas de consumo, con el fin de eliminar a las microcistinas: a) fotocátalisis heterogénea ($\text{UV} + \text{TiO}_2$) (25); b) fotocátalisis heterogénea con el agregado de peróxido de hidrógeno (26); c) adiciones de arcillas (27); d) adición de sustancias húmicas y fotólisis (28); e) biodegradación, utilizando flora microbiana natural, ya sea en forma aislada (29) o en filtros de arena (30 a 32); f) oxidantes químicos (cloro, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno (33).

En este trabajo se analiza la utilización de un tratamiento no convencional de aguas de consumo como es la irradiación ultrasónica, para eliminar la MC-LR. Esta metodología se presenta como una alternativa atrayente debido a la simplicidad de su implementación y a la no generación de compuestos secundarios tóxicos. La irradiación ultrasónica de soluciones acuosas da lugar a la formación, crecimiento y colapso de burbujas en el líquido. Este fenómeno (cavitación) provoca que en el momento de la implosión se den condiciones sorprendentemente altas de presión y temperatura en el punto de colapso ($P > 1000 \text{ atm}$ y $T > 5000 \text{ K}$) (34), favoreciendo la actividad química (35). Particularmente, se produce la formación de radicales hidroxilo, altamente reactivos (36). En la bibliografía existen antecedentes de la utilización del ultrasonido para la degradación de MC-LR, aunque en condiciones diferentes a las efectuadas en nuestro trabajo: a) ya sea por ser MC proveniente de extractos cianobacterianos con contenidos celulares (37); b) MC proveniente de extracto celular tra-

tada a diferente potencia y frecuencia (38); o c) tratamiento de aguas naturales conteniendo *Microcystis aeruginosa* (y la microcistina liberada por las mismas) con un equipo de menor potencia al aquí presentado (39).

2. Materiales y métodos

2.1. Ultrasonido y metodología analítica

Para el tratamiento mediante ultrasonido se utilizó un equipo SONICS Vibra Cell provisto de un cabezal de 13 mm de diámetro, operando a una frecuencia de 20 kHz. La potencia entregada por el equipo fue determinada mediante calorimetría (40) en experiencias efectuadas por triplicado, dando una potencia de 37 Watt.

La degradación se realizó en un reactor de vidrio de 250 ml provisto de camisa de refrigeración por la que se circuló agua para regular la temperatura de operación en $25 \pm 1^\circ\text{C}$. En todas las experiencias se utilizaron 50 ml de soluciones de MC-LR (Sigma, 95% de pureza) con una concentración inicial de 1 mg.l^{-1} en agua destilada deionizada. Con el fin de estudiar el efecto del pH, se reguló el mismo entre los valores de 4 y 8 mediante el agregado de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio en cantidades adecuadas. Para analizar la posible influencia de la concentración inicial en la velocidad de degradación, se prepararon soluciones de MC-LR de tres concentraciones diferentes (0,53 mg/l; 1,01 mg/l y 2,14 mg/l).

Las corridas fueron realizadas por triplicado, tomándose 1 ml de muestra para determinar la concentración de MC-LR por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En un tiempo total de 75 minutos se tomaron 11 muestras para poder evaluar la cinética de la degradación.

La cuantificación de MC-LR se realizó por duplicado mediante un equipo de HPLC

Waters 1525, con una columna de C18 de 5 μ m, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de largo. Se utilizó fase móvil isocrática con 37 % de acetonitrilo y 63 % de agua acidificadas con 0.05 % de ácido trifluoroacético y una temperatura de 40 °C. Para la detección se utilizó un detector UV dual Waters 2487 a una longitud de onda de 238 nm (41). El tiempo de retención fue de 5.2 min. El límite de detección fue de 0.05 mg/l.

2.2. Metodología estadística y computacional

Para analizar las posibles diferencias entre los valores triplicados de las corridas a diferentes valores de pH y de concentraciones iniciales, se utilizó el análisis de la varianza (42).

A fin de calcular la constante de degradación de primer orden se escribió un programa de búsqueda iterativa en MatLab ® utilizando la técnica de autómatas celulares. Un autómata celular es un objeto matemático que consiste en un arreglo uni, bi o tridimensional de celdas, una serie finita de estados y un grupo de reglas de transición. A cada celda se le permite estar en solo uno de los estados, y las reglas de transición son las que posibilitan que las celdas pasen de un estado a otro (43). Por tratarse de una técnica versátil y simple que se adecúa fácilmente a sistemas complejos, los autómatas celulares se utilizan en variados campos: a) previsión tecnológica (44); b) modelado de aparición de innovaciones (45); c) modelado de la dinámica del paisaje (46); d) criptografía (47); e) crecimiento de tumores (48); f) química (49) y g) química cuántica (50).

Dado que los porcentajes de degradación se calcularon con una aproximación de un decimal, se pasaron dichos datos a números enteros multiplicando los mismos por 10. Luego, cada población inicial (igual a 1000)

se distribuyó aleatoriamente en las celdas de un arreglo bidimensional (de 50x50, donde cada celda puede estar en uno de dos estados: vacía/ocupada. La regla de evolución fue de tipo probabilístico: en cada paso de tiempo, a cada celda ocupada se le asigna un valor aleatorio (entre 0 y 1) que se compara con la probabilidad de desaparición por individuo (igual al producto de la constante de velocidad por el incremento de tiempo). Si el valor asignado es menor a la probabilidad de desaparición, la celda cambia de estado. El método es iterativo entre un valor mínimo y uno máximo (propuestos) de la constante de velocidad. Para cada valor de la constante de velocidad analizada, el cálculo se repite 200 veces, promediándose los resultados. Se eligió esta metodología dado que mostró valores de sumas de cuadrados inferiores a las obtenidas mediante linealización utilizando logaritmos.

3. Resultados y discusión

Debido a que para cada valor de pH diferentes se realizaron las corridas por triplicado, se efectuó un ANDEVA con el propósito de comprobar si entre las corridas no existían diferencias significativas a fin de utilizar el promedio correspondiente a cada tiempo para realizar el análisis de su cinética. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Todos los valores de probabilidad (p) son mayores a 0,05, por lo que estadísticamente no existen diferencias significativas entre las repeticiones (al nivel del 95 % de confianza) lo que permite utilizar los valores promedio para el cálculo de las constantes de degradación.

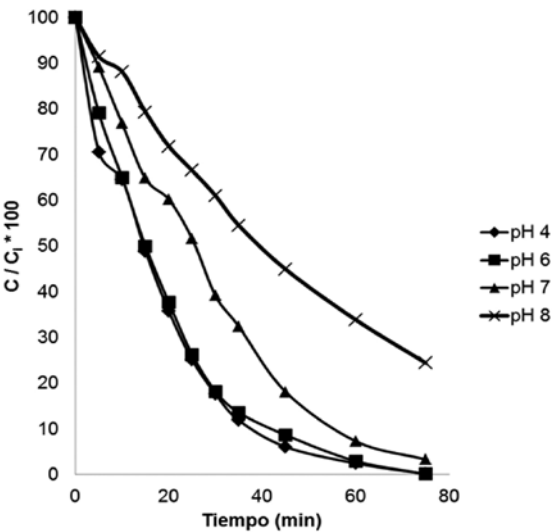
En la Figura 1 se presentan los resultados del decaimiento de la concentración de MC – LR (expresados como porcentajes respecto a la concentración inicial), para los valores de pH estudiados (pH = 4, 6, 7 y 8).

En todos los casos la degradación fue superior al 75 % luego de 75 minutos de sonicación. Puede observarse que a medida que aumenta el pH disminuye la eficiencia del tratamiento, obteniéndose más del 90 % de remoción en pH neutro durante los primeros 60 minutos mientras que en pH ácidos este tiempo es de tan solo 45 minutos.

Tabla 1. ANDEVA de las tres repeticiones realizadas para cada valor de pH. E.G. entre grupos; D.G.: dentro de los grupos; S.C.: suma de cuadrados; g.l.: grados de libertad; C.M.: cuadrados medios; F: estadístico de Snedecor; p: probabilidad.

| | Fuente | S.C. | g.l. | C.M. | F | p |
|----------|--------|------------|------|------------|-----------|--------|
| pH = 4,0 | E.G. | 0.00847879 | 2 | 0.00423939 | 0.0464875 | 0.9546 |
| | D.G | 2.73583 | 30 | 0.0911942 | | |
| | Total | 2.74431 | 32 | | | |
| pH = 6,0 | E.G. | 0.00570188 | 2 | 0.00285094 | 0.0451675 | 0.9559 |
| | D.G | 1.89358 | 30 | 0.0631193 | | |
| | Total | 1.89928 | 32 | | | |
| pH = 7,0 | E.G. | 0.0110839 | 2 | 0.00554194 | 0.0517984 | 0.9496 |
| | D.G | 3.20972 | 30 | 0.106991 | | |
| | Total | 3.2208 | 32 | | | |
| pH = 8,0 | E.G. | 0.0572439 | 2 | 0.0286219 | 0.473001 | 0.6277 |
| | D.G | 1.81534 | 30 | 0.0605114 | | |
| | Total | 1.87258 | 32 | | | |

Figura 1. Curvas de decaimiento de la concentración de MC–LR en función del tiempo, para diferentes valores de pH. C: concentración al tiempo t; Ci: concentración inicial.



Todas las curvas de decaimiento se ajustaron a cinéticas de primer orden, mostrándose en la Tabla 2 los parámetros ajustados. Los datos muestran que todos los ajustes son estadísticamente significativos.

Para el tiempo de vida medio (tiempo que debe transcurrir para que desaparezca la mitad de la concentración inicial de MC – LR), se determinó una relación con el pH del tipo:

$$T = a + b \text{ pH}^c$$

donde T está expresado en minutos, a = 12,01 (minutos); b = 3,08023 e-06 (minutos) y c = 7,68140 con un coeficiente de correlación (R^2) igual a 0,99313. Esta expresión es válida dentro del rango de valores de pH analizados en este trabajo.

Para analizar la posible influencia de la

concentración inicial en la velocidad de degradación, se efectuó en primer lugar el análisis de ANDEVA (Tabla 3) sobre las repeticiones y dado que los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas se ajustaron cinéticas de primer orden a los valores promedios (Tabla 4).

El análisis de dichos datos muestra que los valores de la constante de degradación disminuyen exponencialmente con el aumento de la concentración inicial de MC – LR:

$$k_{Co} = 0,0423 * \exp(-0,30596 * Co)$$

$$R^2 = 0,99995$$

donde k_{Co} es la constante de degradación de primer orden (expresada en min^{-1}) y Co es la concentración inicial de MC – LR (en mg/l), en el rango 0,50 – 2,00 mg/l.

Tabla 2. Valores de las constantes de velocidad de decaimiento de primer orden (k) de la MC–LR para diferentes valores de pH. S(k) = desvío estándar de la constante de decaimiento; R^2 = coeficiente de correlación al cuadrado; T = tiempo de vida medio ($T = \ln(2).k^{-1}$)

| | pH 4 | pH 6 | pH 7 | pH 8 |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|
| k (min^{-1}) | 0,054 | 0,051 | 0,031 | 0,018 |
| S(k) (min^{-1}) | 0.002696 | 0.001965 | 0.002161 | 0.000488 |
| R^2 | 0,99994 | 0,99997 | 0,99993 | 0,99999 |
| T (min) | 12,8 | 13,6 | 22,4 | 38,5 |

Tabla 3. ANDEVA de las tres repeticiones realizadas para cada una de las tres concentraciones iniciales. E.G. entre grupos; D.G.: dentro de los grupos; S.C.: suma de cuadrados; g.l.: grados de libertad; C.M.: cuadrados medios; F: estadístico de Snedecor; p: probabilidad.

| | Fuente | S.C. | g.l. | C.M. | F | p |
|--------------------------------|--------|----------|------|----------|----------|--------|
| $C_0 = 0,53 \text{ mg.l}^{-1}$ | E.G. | 0.000904 | 2 | 0.000452 | 0.017798 | 0.9824 |
| | D.G | 0.761943 | 30 | 0.025398 | | |
| | Total | 0.762848 | 32 | | | |
| $C_0 = 1,01 \text{ mg.l}^{-1}$ | E.G. | 0.021922 | 2 | 0.010961 | 0.102559 | 0.9028 |
| | D.G | 3.20625 | 30 | 0.106875 | | |
| | Total | 3.22817 | 32 | | | |
| $C_0 = 2,14 \text{ mg.l}^{-1}$ | E.G. | 0.100850 | 2 | 0.050425 | 0.165568 | 0.8482 |
| | D.G | 9.13670 | 30 | 0.304557 | | |
| | Total | 9.23755 | 32 | | | |

Tabla 4. Valores de las constantes de velocidad de decaimiento de primer orden (k) de la MC–LR para diferentes concentraciones iniciales (C_0) de MC – LR. S(k) = desvío estándar de la constante de decaimiento; R² = coeficiente de correlación al cuadrado; T = tiempo de vida medio.

| | | | |
|--------------------------|----------|----------|----------|
| C0 (mg/l) | 0,53 | 1,01 | 2,14 |
| k (min ⁻¹) | 0,036 | 0,031 | 0,022 |
| S(k)(min ⁻¹) | 0.001369 | 0.002159 | 0.000515 |
| R ² | 0,99996 | 0.99993 | 0,99996 |
| T (min) | 19,3 | 22,4 | 31,5 |

4. Conclusiones

En este trabajo se muestra la efectividad del ultrasonido en el tratamiento de aguas conteniendo MC – LR. Los resultados indican que para pHs neutro o ácidos, se obtiene más del 90% de la degradación dentro de los primeros 75 minutos. El abatimiento de las concentraciones de MC – LR es dependiente del pH, aunque no muestra con el mismo una relación simple. Entre la disminución de las concentraciones de MC – LR y el aumento de las concentraciones inicia-

les existe una relación exponencial negativa. En la Tabla 5 se muestran resultados obtenidos por diferentes autores, de la degradación de MC–LR por tratamiento con ultrasonido. Lo primero que puede observarse en la misma, es la alta dispersión tanto de resultados como de las condiciones en que se efectuaron los tratamientos, por lo que nuestros resultados amplían la información existente sobre la degradación de la MC–LR mediante ultrasonido.

Tabla 5. Degradación de MC – LR por tratamiento mediante ultrasonido, según diferentes autores. MC–LR: concentración de MC–LR utilizada en el trabajo; V: volumen de muestra utilizada; f (kHz): frecuencia; p (Watt): potencia; T °C: temperatura; t (min): tiempo de aplicación del tratamiento; % deg.: porcentaje de degradación; k (min⁻¹): constante cinética de primer orden; ---: dato no informado; (a): presenta una relación lineal entre concentración y tiempo; (b) aproximadamente 130 minutos (valor tomado de un gráfico); (c): volumen del recipiente = 1570 ml; (d): se informa potencia variable entre 0 y 100 Watt.

| Autor | MC–LR | V ml | f (kHz) | P (Watt) | T °C | pH | t (min) | % deg. | k (min ⁻¹) |
|-------|-------------|------|------------------------------|----------|------|---------------------------------|---------|--------------------------------------|--|
| (51) | 2 µg/l | 400 | 20 | 30 | --- | --- | 30 | 65 | 0,0359 |
| (52) | 2,687 mg/l | 40 | 640 | 500 | 4 | --- | 6 | 85 | (a) |
| (53) | 2,9856 mg/l | 400 | 640 | 500 | 4 | 3,2 3,8 4,7 5,6 9,7 | (b) | | 1,01 0,47 0,66 0,44 0,48 |
| (54) | 500 mg/l | 400 | 640 | 500 | 4 | --- | 90 | 99 | --- |
| (55) | 3,5 µg/l | 235 | 108 200 | 3 | --- | --- | 10 | 72,3 80,8 | --- |
| (56) | 0,5 mg/l | (c) | 20 40 60 100 200 | (d) | 25 | 7 | 30 | 72,2 79,6 81,6 82,8 85,2 | 0,0028 0,0034 0,0072 0,0087 0,0093 |

En (51) las condiciones de frecuencia y potencia son similares a las utilizadas en nuestro trabajo (aunque no se informa acerca de valores de temperatura y pH) y el valor de la constante de degradación es también del mismo orden. Sin embargo, las concentraciones utilizadas son mil veces inferiores. En el mismo trabajo se informa acerca de la disminución de la velocidad de degradación al aumentar la concentración (hecho también encontrado en nuestro trabajo), pero no se precisa ningún valor al respecto.

Las condiciones de los cuatro trabajos

siguientes (52 – 55) son muy diferentes a las que nosotros utilizamos, con resultados también muy distintos. En uno de ellos (53) se muestra que a valores de pH muy ácidos las constantes de decaimiento son mayores que a valores de pH básicos aunque con altibajos a valores de pH intermedios, no existiendo una relación sencilla entre ambos.

En (56) las condiciones de frecuencia, temperatura, pH y concentración son idénticas a las nuestras, aunque en este caso no se informa sobre la potencia y los volúme-

nes podrían también resultar diferentes. Este trabajo presenta una incongruencia entre los resultados mostrados: se informa sobre una constante de decaimiento de primer orden (para 20 kHz) igual a $0,0028 \text{ min}^{-1}$, lo que daría un tiempo de vida medio de 247,55 min; mientras que se informa que en 30 min se degradó el 72.2 %. Este último resultado estaría de acuerdo con una constante diez veces mayor ($0,028 \text{ min}^{-1}$), valor muy semejante al que reportamos en nuestro trabajo.

Los métodos de tratamiento convencionales de aguas de consumo (filtración, coagulación, sedimentación) se muestran como muy ineficientes para la efectiva remoción de la microcistina-LR (57). Tampoco el tratamiento con cloro muestra ser efectivo, debido a que es altamente dependiente del tipo de compuesto utilizado, su concentración y fundamentalmente por dar subproductos tóxicos (58, 59). En vista a los resultados obtenidos en este trabajo, podría pensarse para el tratamiento de aguas potencialmente peligrosas por su contenido en cianotoxinas, en un tratamiento combinado: filtración (a fin de eliminar las células) y luego ultrasonido. Si bien el ultrasonido también se muestra muy efectivo para la inactivación de algas (60, 61), no sería recomendable su utilización directa sobre las aguas crudas debido a que podría liberar las toxinas y aumentaría el costo del tratamiento al necesitarse más tiempo para la degradación de las cianotoxinas.

Referencias bibliográficas

1. Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Gonçalves, F.J.M. y Pereira, M.J. 2004. Microcystin-producing blooms – a serious global public health issue. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 59 (2): 151–163.
2. Roset, J.; Aguayo, S. y Muñoz, M.J. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicol.*, 18: 65 – 71.
3. Carmichael, W. W. 1992. A review: cyanobacteria secondary metabolites — the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.*, 72: 445 – 459
4. Zilliges, Y.; Kehr, J.Ch.; Meissner, S.; Ishida, K.; Mikkat, S.; Hagemann, M.; Kaplan, A.; Borner, T.; Dittmann, E. 2011. The Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin Binds to Proteins and Increases the Fitness of Microcystis under Oxidative Stress Conditions. *PLoS ONE* 6(3): e17615. doi:10.1371: pp: 1 – 11.
5. Sivonen, K.; Niemela, S.I.; Niemi, L.; Lepisto, L.; Luoma, T. H. y Rasanen, L. A. 1990. Toxic cyanobacteria (blue – Green algae) in Finish fresh and coastal waters. *Hydrobiology*, 190: 267 – 275.
6. Codd, G.A.; Ward, C.J. y Bell, S.G. 1997. Cyanobacterial toxins: occurrence, modes of action, health effects and exposure routes. En: *Applied Toxicology: Approaches Through Basic Science. Proceedings of the 1996 EUROTOX Meeting*, 22 – 25/09/96. Alicante (España). Archives of Toxicology Supplement 19. Eds: Seiler, J.P. y Vilanova, E. Springer – Verlag. Pp: 399 – 410.
7. Codd, G.A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. *Ecol. Engin.*, 16: 51 – 60.
8. Yu, S. Z., 1989. Drinking water and primary liver cancer. En: Tang, Z.Y., Wu, M.C., Xia, S.S. (Eds.), *Primary Liver Cancer*. China Academic Publishers, New York, pp. 30 – 37.
9. Yu, S. Z., 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 10: 674 – 682.
10. Grosse, Y.; Baan, R; Straif, K.; Secretan, B; El Ghissassi, F. y Vincent Coglian, V. 2006. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncol.*, 8: 628 – 629.
11. Azevedo, S.M.F.O.; Carmichael, W.W.; Jochimsen, E.M.; Rinehart, K.L.; Lau, S.; Shaw, G.R. y Eaglesham, G.K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis

- treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology*, 181 – 182: 441 – 446.
12. Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.M.; Antunes, M.B.; de MeloFilho, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.T.; Azevedo, S.M.F.O. y Jarvis, W.R. 1998. *New Engl. J. Med.*, 338: 873 – 878.
 13. Pouria, S.; de Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R.L.; Barreto, V.T.S.; Ward, C.J.; Preiser, W.; Poon, G.K.; Neild, G.H. y Codd, G.A. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 352 (9121): 21 – 26.
 14. Rivasseau, C.; Martins, S. y Hennion, M.C. 1998. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *J. Chromatog. A*, 799: 155 – 169.
 15. Dawson, R.M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36 (7): 953 – 962.
 16. Moreno, I.; Repetto, G. y Cameán, A. 2003. Interés toxicológico de las microcistinas. *Rev. Toxicol.*, 20 (3): 159 – 163.
 17. Vela, L.; Sevilla, E.; Martínez Rica, J.P.; Pellicer, S. y Bes, M.T. 2007. Las microcistinas. *Revista de la Academia de Ciencias Exactas, Físico – Químicas y Naturales de Zaragoza*, 62: 135 – 146
 18. Falconer, I.R.; Dornbush, M.; Moran, G. y Yeung, S.K. 1992. Effect of the cyanobacterial (blue – green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicon*, 30 (7): 790 – 793.
 19. MacKintosh, C.; Beattie, K.A.; Klumpp, S.; Cohen, P. y Codd, G.A. 1990. Cyanobacterial-microcystin – LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS letters*, 264 (s): 187 – 192.
 20. Honkanen, R.E.; Zwiller, J.; Moore, R.E.; Daily, S.L.; Khatra, B.S.; Dukelow, B.S. y Boynton, A.L. 1990. Characterization of microcystin – LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 265: 19401 – 19404.
 21. Metcalf, J.S. y Codd, G.A. 2000. Microwave oven and boiling waterbath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells. *Microbiol. Lett.*, 184 (2): 241 – 246.
 22. Harada, K.; Tsuji, K.; Watanabe, M.F. y Kondo, F. 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria — III. Effect of pH and temperature. *Phycol.* 35 (6S): 83 – 88.
 23. Holts, T.; Jorgensen, N.O.G.; Jorgensen, C. y Johansen, A. 2003. Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions. *Wat. Res.*, 37: 4748 – 4760.
 24. WHO. 1998. Cyanobacterial toxins: microcystins in drinking water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO/SDE/WSH/03.04/57. 18 pág.
 25. Shephard, G.S.; Stockenstrom, S.; De Villiers, D.; Engelbrecht, W.J.; Sydenham, E.W. y Wessels, G.F.S. 1998. Photocatalytic degradation of cyanobacterial microcystin toxins in water. *Toxicon*, 36 (12): 1895 – 1901.
 26. Cornish, B.J.P.A.; Lawton, L.A. y Robertson, P.K.J. 2000. Hydrogen peroxide enhanced photocatalytic oxidation of microcystin – LR using titanium dioxide. *App. Catal. B*; 25 (1): 59 – 67.
 27. Morris, R.J.; Williams, D.E.; Luu, H.A.; Holmes, C.F.B.; Andersen, R.J. y Calvert, S.E. 2000. The adsorption of microcystin – LR by natural clay particles. *Toxicon* 38: 303 – 308.
 28. Welker, M. y Steinberg, C. 1999. Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. *Wat. Res.*, 33 (5): 1159 – 1164.
 29. Manage, P.M.; Edwards, C. y Lawton, L.A. 2010. Bacterial degradation of microcystin. En: *Interdisciplinary Studies in Environmental Chemistry – Biological Responses to Contaminants*. Eds. Hamamura, N., Suski, S., Mendo, S., Barroso, C.M., Iwata, H. y Tanabe, S. pp: 97 – 104.

- 30.** Babica, P.; Blaha, L. y Marsalek, B. 2005. Removal of microcystins by phototrophic bio-films. A microcosm study. *Environ. Sci. Poll. Res.*, 12 (6): 369 – 374.
- 31.** Bourne, D.G.; Blakeley, R.L.; Riddles, P. y Jones, G.J. 2006. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin – LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Wat. Res.* 40: 1294 – 1302.
- 32.** Ho, L.; Meyn, T.; Keegan, A.; Hoefeld, D.; Brookes, J.; Saint, C.P. y Newcombe, G. 2006. Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter. *Wat. Res.*, 40 (4): 768 – 774.
- 33.** Pyo, D. y Yoo, J. 2008. Degradation of cyanobacterial toxin, microcystin – LR, using chemical oxidants. *J. Immunoassay/Immunochem.*, 29: 211 – 219.
- 34.** Adewuyi, Y.G. 2001. Sonochemistry: environmental science and engineering applications. *Ind. Eng. Chem.* 40: 4681 – 4715.
- 35.** Suslick, K.S. 1990. Sonochemistry. *Science* 247 (4949): 1439 – 1445.
- 36.** Gonzalez – Labrada, K.; Quesada – Peñate, I.; Julcour – Lebigue, C.; Delmas, H.; Cruz González, G. y Jáuregui – Haza, U.J. 2010. El empleo del ultrasonido en el tratamiento de aguas residuales. *Rev. CENIC Cs. Quím.*, 41: 1 – 11.
- 37.** Song, W., Teshiba, T., Rein, K. y O'Shea, K.E. 2005. Ultrasonically induced degradation and detoxification of microcystin–LR (Cyanobacterial toxin). *Environ. Sci. Technol.*, 39: 6300 – 6305.
- 38.** Song, W.; de la Cruz, A.A.; Rein, K. y O'Shea, K.E. 2006. Ultrasonically induced degradation of microcystin – LR and – RR: Identification of products, effect of pH, formation and destruction of peroxides. *Environ. Sci. Technol.*, 40 (12): 3941 – 3946.
- 39.** Srisuksomwong, P.; Whangchai, N.; Yagita, Y., Okada, K., Peerapornpisal, Y. y Nomura, N. 2011. Effects of ultrasonic irradiation on degradation of microcystin in fish ponds. *Int. J. Agric. Biol.*, 13 (1): 67 – 70.
- 40.** Thompson, L.H. y Doraiswamy, L.K. 1999. Sonochemistry: science and engineering. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38: 1215 – 1249.
- 41.** Sanches, S.M.; Vieira, E.M.; Prado, E.L.; Benetti, F. y Takayanagui A.M.M.. 2007. Estudo da presença da toxina microcistina–LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. *Eclét. Quím.*, 32 (4): 43 – 48.
- 42.** Winer, B.J. 1971. Statistical principles in experimental design. McGraw Hill Book Company. Second edition. New York. 907 pág.
- 43.** Caligaris, M.G. y Rodriguez, G.B. 2010. Simulaciones computacionales: autómatas celulares. *Primer Congreso sobre Los métodos numéricos en la enseñanza, la ingeniería y las ciencias. EMMUS 2010. Facultad Regional Haedo, UTN.* 18 – 20/08/2010 (9 páginas).
- 44.** Martino, J.P. 2003. A review of selected recent advances in technological forecasting. *Tech. For. Soc. Chang.*, 70 (8): 719 – 733.
- 45.** Goldenberg, J. y efroni, S. 2001. Using cellular automata modeling of the emergence of innovations. *Tech. For. Soc. Chang.*, 68 (3): 293 – 308.
- 46.** Soares–Filho, B.S.; Coutinho Cerqueira, G. y Lopes Pennachin, C. 2002. DINAMICA – a stochastic cellular automata model designed to simulate the landscape dynamics in an Amazonian colonization frontier. *Ecol. Model.*, 154 (3): 217 – 235.
- 47.** Nandi, S.; Kar, B.K. y Chaudhuri, P.P. 1994. Theory and applications of cellular automata in cryptography. *IEEE Trans. Comp.*, 43 (12): 1346 – 1357.
- 48.** Kansal, A.R.; Torquato, S.; harsh, G.R.; Chiocca, E.A. y Deisboeck, T.S. 2000. *J. Theor. Biol.*, 203: 367 – 382.
- 49.** Kier, L.B. y Cheng, C.K. 1994. A cellular automata model of water. *J. Chem. Inf. Model.*, 34 (3): 647 – 652.
- 50.** Tokunaga, K. 2011. Quantum–Chemical Design of Molecular Quantum – Dot Cellular Automata (QCA): A New Approach from Fron-

- tier Molecular Orbitals. En: Cellular Automata – Innovative Modelling for Science and Engineering. Salcido, A. (Ed.). Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/cellular-automata-innovative-modelling-for-science-and-engineering/quantum-chemical-design-of-molecular-quantum-dot-cellular-automata-qca-a-new-approach-from-frontier>. pp: 153 – 176.
- 51.** Ma, B.; Chen, Y.; Hao, H.; Wu, M.; Wang, B.; Liv, H. y Zhang, G. 2005. Influence of ultrasonic field on microcystins produced by bloom-forming algae. *Coll. Surf. B*, 41: 197 – 201.
- 52.** Song, W.; de la Cruz, A.A.; Rein, K. y O'Shea, K.E. 2006. Ultrasonically induced degradation of microcystin – LR and –RR: Identification of products, effect of pH, formation and destruction of peroxides. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 3941 – 3946.
- 53.** Song, W.; Teshiba, T.; Rein, K. y O'Shea, K.E. 2006. Ultrasonically induced degradation and detoxification of microcystin – LR (cyanobacterial toxin). *Environ. Sci. Technol.*, 39: 6300 – 6305.
- 54.** Hudder, A.; Song, W.; O'Shea, K.E. y Walsh, P.J. 2007. Toxicogenomic evaluation of microcystin – LR treated with ultrasonic irradiation. *Tox. App. Pharm.*, 230: 357 – 364.
- 55.** Srisuksomwong, P.; Whangchai, N.; Yagita, Y., Okada, K. Peerapornpisal, Y. y Nomura, N. 2011. Effect of ultrasonic irradiation on degradation of microcystin in fish ponds. *Int. J. Agric. Biol.*, 13(1): 67 – 70.
- 56.** Shi, J.; Han, X.; Zhu, Z. y Deng, H. 2012. Identification of cytotoxicity intermediate products and degradation pathways for microcystins using low-frequency ultrasonic irradiation. *Water Air Soil Pollut*, 223: 5027 – 5038.
- 57.** Acero, J.L.; Rodriguez, E.; Majado, M.E.; Sordo, A. y Meriluoto, J. 2008. Oxidation of microcystin – LR with chlorine and permanganate during drinking water treatment. *J. Wat. Supp. Res. Tech.* – AQUA, 57: 371 – 380.
- 58.** Hitzfeld, B.C.; Hoyer, S.J. y Dietrich, D.R. 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Persp.*, 108: 113 – 122.
- 59.** Kull, T.P.J.; Backlund, P.H.; Karlsson, K.M. y Meriluoto, J.A.O. 2004. Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin – LR by chlorine dioxide: reaction kinetics, characterization, and toxicity of reaction products. *Environ. Sci. Technol.* 38 (22): 6025 – 6031.
- 60.** Devercelli, M.; Krohling, M. y Kieffer, L. 2004. Irradiación ultrasónica para control de floraciones algales. 1er Congreso latinoamericano sobre Biotecnología Algal. Buenos Aires, 25 – 29 de octubre.
- 61.** Rajasekhar, P.; Fan, L.; Nguyen, T. y Roddick, F.A. 2012. Impact of sonication at 20 kHz on *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena circinalis* and *Chlorella* sp. *Wat. Res.*, 46: 1473 – 1481.